

HYDROLYSIS OF DIACYLGLYCEROLINE LIPID

Patent Number: JP3123493

Publication date: 1991-05-27

Inventor(s): HIBINO HIDEHIKO; others: 02

Applicant(s):: NIPPON OIL & FATS CO LTD

Requested Patent: JP3123493

Application Number: JP19890258750 19891005

Priority Number(s):

IPC Classification: C12P9/00

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To produce a monoacylglyceroline lipid in a good yield in a mild condition and enable mass production thereof by hydrolyzing a diacylglyceroline lipid such as phosphatidylethanolamine using a respectively specified enzyme and reaction solvent.

CONSTITUTION: Phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylino- sitol or phosphatidylglycerol obtained by chemical synthesis or by isolation from a natural lipid are hydrolyzed using pig pancreas-derived phospholipase A2 in a reaction solution prepared by addition of 0.01-2 vol.% water to a nonionic non-polar solvent to obtain the objective monoacylglyceroline lipid.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2



⑯日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A)

平3-123493

⑬Int.Cl. 5

C 12 P 9/00
// C 07 F 9/10

識別記号

庁内整理番号

A

8114-4B
8619-4H

⑭公開 平成3年(1991)5月27日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮発明の名称 ジアシルグリセロリン脂質の加水分解法

⑯特 願 平1-258750

⑰出 願 平1(1989)10月5日

⑱発明者 日比野 英彦 東京都練馬区旭丘2丁目22番1号

⑲発明者 福田 信雄 茨城県つくば市梅園2丁目24番5号

⑳発明者 仲地 理 茨城県牛久市下根町1044-10

㉑出願人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号

㉒代理人 弁理士 舟橋 栄子

明細書

1. 発明の名称

ジアシルグリセロリン脂質の加水分解法

2. 特許請求の範囲

化学合成又は天然脂質原料から単離したホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールまたはホスファチジルグリセロールを加水分解する際に、豚臍膜由来のホスホリバーゼA₂酵素を用い、非イオン性無極性有機溶媒に0.01~2容量%の水を添加した反応液中で反応させ、モノアシルグリセロリン脂質を得ることを特徴とするジアシルグリセロリン脂質の加水分解法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ジアシルグリセロリン脂質を加水分解する方法、詳しくはジアシルグリセロリン脂質の脱アシル化により、モノアシルグリセロリン脂質を得る方法に関する。

(従来の技術)

ホスホリバーゼA₂は、系統名ホスファタイト2-アシルハイドローゼとも呼ばれ、ジアシルグリセロリン脂質のSn-2位にエステル結合している脂肪酸を、位置特異的に加水分解する酵素である。

豚臍膜由来の精製ホスホリバーゼA₂活性の測定は、卵黄1個を蒸留水100mlに懸濁した液10mlに、酵素液、塩化カルシウム溶液(最終濃度6×10⁻³M)およびデオキシコール酸(最終濃度2.7×10⁻³M)を加えて全量を30mlとし、pHスタットを用いてpH8.0、40℃にて0.1N水酸化ナトリウムで滴定する(G.H. de Haasら、Biochim. Biophys. Acta, 159, 103, (1968))。この方法の分解条件は緩衝液でpH8に調整し、塩化カリウム濃度を6mmに調整する必要がある。そのため、この方法は乳化系反応であり反応生成物の精製が難しい。

合成されたジアシルグリセロリン脂質に関し、ホスファチジルエタノールアミン100nMがホスホリバーゼA₂、5mM塩化カルシウム、0.3%デオキシコール酸ナトリウム、50mMグリシン-水酸化ナ



トリウム緩衝液 (pH9.0) 共存下に30~120分反応させている (T.Teramotoら、J.Biochem. (Tokyo), 93, 1353, (1983))。この方法の分解条件も緩衝液でpH 9に調整し、塩化カルシウム濃度を5 mMに調整する必要がある。そのため、この方法も乳化系反応であり、反応生成物の精製が難しい。

天然脂質原料から単離されたジアシルグリセロリン脂質の加水分解法に関しては、ホスファチジン酸とカルジオリビンが検討されている。ヘビ毒ホスホリバーゼA₂によるホスファチジン酸の加水分解は、ホスファチジン酸と反応促進のためのレシチンを先ずエチルエーテルに溶かす。ヘビ毒ホスホリバーゼA₂と塩化カルシウムを0.1Mトリス一塩酸緩衝液 (pH7.5) に溶かした酵素溶液を加え、37°Cで1時間反応させている (H.Okuyamaら、J.Biol.Chem., 247, 1414, (1972))。ハブ毒ホスホリバーゼA₂によるカルジオリビンの加水分解は、カルジオリビンをエチルエーテルに溶かし、ハブ毒ホスホリバーゼA₂と酢酸カルシウムを0.1Mホウ酸ナトリウム (pH7.0) に溶かした

ものを加え、激しく攪拌しながら27°Cで8時間反応させている (H.Okuyamaら、J.Biochem., 37, 529 (1965))。これらの加水分解条件は緩衝液でpHを調整し、さらにカルシウム塩濃度を調整する必要がある。そのため、これらの方法も乳化系反応であり、反応生成物の精製が難しい。

(発明が解決しようとする課題)

前記のような従来から知られている加水分解法では処理できる基質量が少ない。また、入手の難しい高価な加水分解酵素を使用したり、pHやカルシウム塩濃度を厳密にコントロールしながら反応させなければならず、反応生成物も純粋なものが得難く大量生産出来ないという難点があった。

従って現在、入手が容易で安価で、しかも加水分解能の高い天然起源の酵素を利用し、工業的に大量生産が可能で、しかも反応生成物の分取が容易なモノアシルグリセロリン脂質の製造法が求められている。

本発明は、加水分解能を有する天然起源の安価な酵素を用いることにより、化学合成又は天然脂

質原料から単離して得たジアシルグリセロリン脂質を加水分解して、モノアシルグリセロリン脂質を工業的に大量生産する新規な方法を提供しようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は、化学合成又は天然脂質原料から単離したホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールまたはホスファチジルグリセロールを加水分解する際に、豚臍臓由来のホスホリバーゼA₂酵素を用いて、非イオン性無極性有機溶媒に0.01~2容量%の水を添加した反応液中で反応させ、モノアシルグリセロリン脂質を得ることを特徴とする。

本発明に用いられるホスホリバーゼA₂酵素は、基質とするジアシルグリセロリン脂質の範囲の広さ、上記の有機溶媒系反応によるホスホリバーゼA₂活性の強さと条件の簡易さ、酵素の価格および除去の簡便さから豚臍臓由来のものである。ホスホリバーゼA₂活性を示す酵素はホスホリバーゼA₂、パンクリアチン、微生物起源のリバーゼ

が知られているが、ホスファチジルコリン以外の酸性ジアシルグリセロリン脂質に対する加水分解能が著しく低い。また、ホスホリバーゼA₂は哺乳動物の各組織、肝、赤血球、血小板、多形核白血球、腸水肝癌細胞などのほか、大腸菌、真菌などの微生物、蛇毒に存在している。

本発明に用いられる豚臍臓を酵素源とするホスホリバーゼA₂は、精製法がハースら (Biochim. Biophys. Acta, 159, 103, (1968)) によって確立された活性の高い安価な市販品もあり、これらを利用することが出来る。市販品のホスホリバーゼA₂にはヘビ毒由来、ハチ毒由来および細菌由来のものがあるが、非常に高価である。しかも本発明の加水分解条件では、微量の基質を処理出来るが、大量の基質では高い分解率は得られない。一方、豚臍臓由来のホスホリバーゼA₂はmg単位までの同一条件で分解が出来、酵素から混入してくる不純物もなく、あっても簡単な処理法によって反応生成物から除去出来る。

本発明における加水分解は、例えば化学合成又

は天然脂質原料から単離したジアシルグリセロリン脂質1部を、後述する有機溶媒10～500部に溶解し、これにホスホリバーゼA₂を加えて行われる。酵素量は通常ジアシルグリセロリン脂質1gに対して0.01～5.0g程度でよい。反応温度は、10℃から使用する有機溶媒の沸点の範囲で任意に選択できるが、反応効率を考えると、室温から50℃までの温度が望ましい。また、この方法は豚臍膜由来のホスホリバーゼA₂の熱安定性が良く、70℃でも活性を示す。

反応時間は酵素量や反応温度によって異なるが、通常1～10時間程度である。また、従来のホスホリバーゼA₂を用いるジアシルグリセロリン脂質の有機溶媒と大量の緩衝液やカルシウム塩溶液を使用する界面反応においては、攪拌速度が反応進行率に大きな影響を与えたが、本発明では通常60～150rpmの低速攪拌で充分に反応が進行する。また、従来のホスホリバーゼA₂の反応では、反応進行にカルシウム塩溶液やpH調整用の緩衝液の添加が必要であったが、本発明では、これらの溶液

を必要としないため反応終了後の精製も容易である。

本発明における酵素反応は加水分解反応であるため、加水分解に必要な最少量の水の添加が望ましい。水は有機溶媒中に0.01～2容量%になるよう添加する。この範囲の水量では、反応終了後の溶媒による再沈、乾燥濃縮、濾過剤処理等の精製手段により容易に脱水され、特別な脱水工程を必要としない。水の添加が0.01容量%未満では充分に加水分解が行われず、2容量%を超えると、水除去に伴う反応液の発泡現象、反応生成物の損失等を生じ、また、余分な脱水工程が必要になり、コストと時間がかかるてしまう。

本発明に用いられる非イオン性無極性有機溶媒は、エーテル、炭化水素、エステルの群から選ばれる。具体例としては、エーテルとしてジエチルエーテル、イソブロピルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン等、炭化水素としてn-ヘキサン、n-ヘプタン、石油エーテル、シクロヘキサン等、エステルとして酢酸メチル、酢酸エチル

等が挙げられる。これらの有機溶媒は非イオン性無極性溶媒であり、酵素は、これら溶媒との接触によっても活性が低下しない。また基質であるジアシルグリセロリン脂質に対してもある程度溶解することが出来る。この溶媒中で反応物の親水性の強いモノアシルグリセロリン脂質は微少の水層に移行し、恰もこの水は相間移動触媒の役割を果たすことが出来る。

これら以外の有機溶媒では、例えば、ハロゲン化炭化水素やアプロテックな非イオン性極性溶媒では酵素の活性が發揮出来ない。ジクロロエタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素中では酵素が失活する。メタノール、エタノール等は酵素の阻害剤であり、アセトン、アセトニトリル、ジメチルスルホキサイド、ジメチルホルムアミド等の非イオン性極性溶媒は蛋白質である酵素を一部溶解し、酵素の構造を変化させ活性を失わせる恐れがある。

本発明において用いるホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジ

ルイノシトール、ホスファチジルグリセロールは化学合成、天然脂質原料から単離したもの及び市販の純粋な試薬が使われる。これらの原料は脂質化学上、グリセロリン脂質に属し、特にアシル基を2個有するジアシルグリセロリン脂質が対象となる。

ホスファチジルエタノールアミンは卵黄脂質、ラット肝脂質、大豆粗リン脂質からケイ酸カラムクロマトグラフィーを用いてコリン含有リン脂質溶出後に単離できる。(例えばR.Anejaら、*Biochim.Biophys.Acta*, 187, 439 (1969))。また、無水フタル酸処理する半合成法(A.J.Slotboomら、*Chem.Phys.Lipids*, 5, 301 (1970))や、トリチル化誘導体を用いる全合成法(A.Hermetterら、*Chem.Phys.Lipids*, 43, 69 (1987))によっても合成品が得られる。

ホスファチジルセリンは牛脳脂質の粗ケファリン分画から重ソウ処理ケイ酸カラムクロマトグラフィーやDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでカリウム塩として単離出来る(例えば、

特開昭63-229783号、ホスファチジルセリンの製造方法）。また、アミノ酸誘導体を用いる化学的合成法（A.J.Slotboomら、*Chem.Phys.Lipids*, 51, 301 (1970)）によっても合成品が得られる。

ホスファチジルイノシトールは、乾燥パン酵母にトルエンとイソプロパノールで処理した後の抽出物をケイ酸カラムクロマトグラフィーにかけ、グラジェント溶出で単離出来る。同様の方法を用いて、麦芽、牛脳、肝臓、大豆等からも単離出来る。また、ミオイノシトールの水酸基をベンジル基で保護する半合成法（特開昭63-33388号、ホスファチジルイノシトール類の製造方法）によっても合成品が得られる。

ホスファチジルグリセロールは大豆、卵黄、グラム陽性菌等から抽出した脂質を、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけたり、さらにケイ酸カラムクロマトグラフィーを併用することで単離出来る。また、グリセロールの存在下で、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンなどを基

質として、ホスホリバーゼDを働かせ、アルコール化させる合成法（D.M.Michaelsonら、*Biochemistry*, 12, 2637 (1973)）によっても合成品が得られる。

本発明において用いるジアシルグリセロリン脂質の水素添加物も原料の対象となる。水素添加物はジアシルグリセロリン脂質に触媒として5または10% Pd/C、溶媒としてn-ヘキサン/エタノール（4:1）を用い、水素圧10kg/cm²、温度50~55℃、反応時間2~4時間の反応条件（原節子ら、日本栄養・食糧学会誌、39, 391 (1986)）により、容易に調製される。

(発明の効果)

本発明によれば、下記のような効果が得られる。

- (1) 温和な反応条件で収率良く目的化合物が製造できる。
- (2) 反応液中に無機物を添加しないため、反応生成物の精製が容易である。
- (3) 水添加量が微量なため、特別な脱水工程を必要とせず、また均一系に近い反応のため、反応時

に激しい攪拌を必要としない。

(4) 本発明で得られるモノアシルグリセロリン脂質の一つであるリゾホスファチジルセリンは、免疫グロブリンEの関与するヒスタミン遊離作用に特異的な効果を示す等の報告から、本発明で用いられる目的化合物は、種々な医薬品への応用が期待される。

(5) 本発明で対象原料としなかったアシル化リン脂質、例えば、プラズマローゲン型リン脂質、カルジョリビン、ホスファチジル-N-メチルエタノールアミン類などの加水分解にも応用出来る。

従って、本発明はモノアシルグリセロリン脂質の工業的製造法として極めて好適である。

(実施例)

以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明する。尚、各例中、%は重量基準である。

実施例1

卵黄脂質からケイ酸カラムを用いて単離したホスファチジルエタノールアミン（含量99%、イタロスキャン法）10gをエチルエーテル500ml及

び豚臍由来のホスホリバーゼA₂（ノボインダストリー社製、レシターゼ10L）4.5g（ホスホリバーゼA₂ 450mg 含有；水の量 4.1ml）に添加し、攪拌子で緩やかに攪拌し、室温で6時間おいた。経時後、エチルエーテルをデカンテーションで除去し、新しいエチルエーテル300mlを加えて攪拌し、再度、デカンテーションでエチルエーテルを除去した。さらに冷アセトン300mlで3回攪拌洗浄とデカンテーションを繰り返し、粗生成物を乾燥濃縮した。この濃縮物をクロロホルム/メタノール同量混液300mlに溶解し、この溶液中に濾過助剤（ダイカライトオリエント社製、ダイカライト・パーライト）5gを添加し、攪拌後、濾過してその母液を蒸留乾燥して5.2gの黄色のロウ状物を得た。

黄色のロウ状物の分析値は下記の通りであった。

① TLC

メルク社製TLC (Plate Silica Gel 60)、20×20cm、厚さ0.25mm、展開液：クロロホルム/メタノール/水 65/25/4 (v/v/v)

発色剤：ディトマーレスター試薬
Rf値0.55に非常に弱く、0.22に強く青色に呈色。
②TLC-FID (イヤトロスキャン法)
展開液：TLCと同様
薄層棒：クロマロッド-S II型
分析結果：
ホスファチジルエタノールアミン 3%
リゾホスファチジルエタノールアミン 94%
その他 3%

実施例2

卵黄脂質からケイ酸カラムを用いて単離したホスファチジルエタノールアミンを原らの方法（前出）に準拠し、Pd/C触媒を用い完全水添（1. V.2）ホスファチジルエタノールアミン（含量99%、イヤトロスキャン法）を調整した。水添ホスファチジルエタノールアミン10gを酢酸エチル1000mlに溶解し、次いで、豚脛臓由来のホスホリバーゼA₂（ノボインダストリー社製、レシターゼ10Lの凍結乾燥品）1gと蒸留水1mlを添加し、攪拌子で緩やかに攪拌した。40℃で4時間反応した。後

の処理は実施例1に従い、5.4gの白色粉末を得た。

白色粉末の分析値は下記の通りであった。

①TLC

実施例1と同じ条件

Rf値0.59に非常に弱く、0.24に強く青色に呈色。

②TLC-FID (イヤトロスキャン法)

実施例1と同じ条件

分析結果

ホスファチジルエタノールアミン	2%
リゾホスファチジルエタノールアミン	95%
その他	3%

実施例3

牛脳脂質を溶剤分別とケイ酸カラムクロマトグラフィーを用いて単離したホスファチジルセリン（ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩の混合物、含量98%、イヤトロスキャン法）2gをジオキサン1000mlに溶解し、次いで豚脣臓由来のホスホリバーゼA₂（ノボインダストリー社製、レシターゼ10Lの凍結乾燥品）1gと蒸留水0.5mlを添加し、攪拌子で緩やかに攪拌した。30℃で7

時間反応した。後の処理は実施例1に従い、0.9gの白色粉末を得た。

白色粉末の分析値は下記の通りであった。

①TLC

実施例1と同じ条件

Rf値0.24に非常に弱く、0.12に強く青色に呈色。

②TLC-FID (イヤトロスキャン法)

実施例1と同じ条件

分析結果

ホスファチジルセリン	4%
リゾホスファチジルセリン	92%
その他	4%

実施例4

パン酵母にトルエンとイソプロパノールで自己分解させた後に脂質抽出を行い、この抽出物をケイ酸カラムを用いて単離したホスファチジルイノシトール（含量99%、イヤトロスキャン法）1gをジオキサン25mlに加熱溶解し、次いで豚脣臓由来のホスホリバーゼA₂（ノボインダストリー社製、レシターゼ10Lの凍結乾燥品）1gと蒸留水0.1

mlを添加し攪拌子で緩やかに攪拌した。50℃で10時間反応した。後の処理は実施例1に従い、0.7gの黄色のロウ状物を得た。

黄色のロウ状物の分析値は下記の通りであった。

①TLC

実施例1と同じ条件

Rf値0.23と0.18に青く呈色したスポットが認められる。

②TLC-FID (イヤトロスキャン法)

実施例1と同じ条件

分析結果

ホスファチジルイノシトール	45%
リゾホスファチジルイノシトール	50%
その他	5%

実施例5

大豆リン脂質からDEAE-セルロースカラム処理とケイ酸カラム処理を用いて単離したホスファチジルグリセロールを原らの方法（前出）に準拠しPd/C触媒を用いて、完全水添（1. V.5）ホスファチジルグリセロール（ナトリウム塩、含量

95%、イヤトロスキャン法) 2 g をエチルエーテル 400 mL に溶解し、次いで豚臍臍由来のホスホリバーゼ A₂ (ノボインダストリー製、レシターゼ 10 U の凍結乾燥品) 4 g と蒸留水 4 mL を添加し、攪拌子で緩やかに攪拌した。25°C で 5 時間反応した。後の処理は実施例 1 に従い、1.1 g の白色粉末を得た。

白色粉末の分析値は下記の通りであった。

① TLC

実施例 1 と同じ条件

RF 値 0.55 に非常に強く、0.22 に強く青色に呈色したスポットが認められる。

② TLC-FID (イヤトロスキャン法)

実施例 1 と同じ条件

分析結果

ホスファチジルグリセロール	5%
リゾホスファチジルグリセロール	91%
その他	4%

比較例 1

実施例 1 の反応条件のうちエチルエーテルをメ

タノールに換えて同様に反応した。後の処理は実施例 1 に従い、8.3 g の黄色のロウ状物を得た。

黄色のロウ状物の分析値は下記の通りであった。

① TLC

実施例 1 と同じ条件

RF 値 0.55 に強く、0.22 に弱く青色に呈色したスポットが認められる。

② TLC-FID (イヤトロスキャン法)

実施例 1 と同じ条件

分析結果

ホスファチジルエタノールアミン	92%
リゾホスファチジルエタノールアミン	5%
その他	3%

以上の結果より、本法の豚臍臍由来のホスホリバーゼ A₂ によるジアシルグリセロリン脂質の加水分解に関し、非イオン性無極性溶媒を使用しない条件では、分解反応が進行しないことが判明した。

比較例 2

実施例 1 の反応条件のうち水の添加量を 50 mL に

換えて同様に反応した。低速攪拌ではエーテル層と水層が分離するので、全体を均一に保つため、攪拌子で激しく攪拌し乳化状態にした。反応終了後、減圧下に溶媒を留去し、さらに連続的に脱水を試みたが、反応液に発泡現象が認められた。そのためベンゼン 50 mL を加えて減圧蒸留を 3 回繰り返して脱水した。この蒸留残渣を冷アセトン 200 mL で 2 回攪拌とデカンテーションを行い粗生成物を得た。この粗生成物をクロロホルム/メタノール同量混液に溶解したが、この溶媒に不溶な物質が出現した。この物質は脱水前の反応溶媒には認められなかった。

以上の結果から、本法に比べて従来法では厳しい反応条件が要求され、さらに反応生成物の脱水や精製が困難であり、特別な工程が必要であった。

比較例 3

実施例 5 の反応条件のうち、蒸留水の量は 10 mL (0.01 L) で反応を行った。後の処理は実施例 1 に従い、1.7 g の白色粉末を得た。

白色粉末の分析値は下記の通りであった。

① TLC

実施例 1 と同じ条件

RF 値 0.56 に強く、0.26 に非常に弱く青色に呈色したスポットが認められた。

② TLC-FID (イヤトロスキャン法)

実施例 1 と同じ条件

分析結果

ホスファチジルグリセロール	87%
リゾホスファチジルグリセロール	7%
その他	6%

以上の結果から、本法の酵素によるジアシルグリセロリン脂質の加水分解に関し、蒸留水が 0.01 容量 % 以下の条件では、分解率が低下することが判明した。

特許出願人 日本油脂株式会社

代理人 弁理士 舟橋栄子



